



ESCUELA DE  
MEDICINA  
U D S



**NOMBRE: OLIVER FAUSTINO PAREDES  
MORATAYA**

**DOCENTE: DR. GUILLERMO DEL SOLAR  
VILLAREAL**

**BIOQUIMICA**

**LIC. EN MEDICINA HUMANA**

**TÉCNICAS DE SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN Y  
CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.**

## INTRODUCCION

A lo largo de este tema vamos a estudiar las distintas técnicas que nos permiten analizar desde un punto de vista cual y cuantitativo, el contenido proteico de las muestras biológicas haciendo especial hincapié en el estudio de las proteínas plasmáticas, las proteínas están presentes en todas las células y en los distintos líquidos corporales: suero o plasma (66-83g/L), orina (100-200 mg/L), líquido cefalorraquídeo (15-45 mg/dL), si nos centramos en las proteínas plasmáticas, podemos diferenciar:

- Proteínas plasma-específicas: componentes habituales del plasma.
- Proteínas no plasma-específicas: aquellas que aparecen en el plasma

por rotura de otras células, las proteínas plasma-específicas (albúmina + globulinas) se sintetizan fundamentalmente en el hígado, pero también en: células plasmáticas, ganglios linfáticos, bazo y médula ósea.

## DESARROLLO

Técnicas de separación y análisis de las proteínas La proporción de las fracciones proteicas individuales cambia en el transcurso de un gran número de enfermedades lo que conlleva que, la cuantificación de las mismas sea de valor considerable en el diagnóstico clínico, Los procedimientos más utilizados actualmente en el laboratorio clínico para el estudio de las proteínas son los siguientes:

1. Turbidimetría y nefelometría
2. Inmunodifusión
3. Electroforesis
4. Inmunoelectroforesis
5. Inmunoelectroforesis en cohete
6. Inmunofijación
7. Cromatografía

**TURBIDIMETRÍA Y NEFELOMETRÍA** Cuando un haz de luz choca con una partícula en suspensión parte de la luz se dispersa, parte de la luz se refleja y parte de la luz se absorbe. La dispersión de la luz depende de: la longitud de onda de la luz (?), del tamaño de la partícula y del índice de refracción de la partícula en relación con el medio que la rodea. La dispersión de la luz se puede medir por turbidimetría o por nefelometría. En ambas técnicas, para dar como resultado una concentración de proteína concreta, se compara la cantidad de luz dispersada o la tasa de aumento de dispersión con los valores de dichos parámetros en estándares proteicos conocidos

**turbidimetría** mide la disminución de la luz transmitida a través de una suspensión de partículas utilizando para ello un espectrofotómetro (detector en la misma dirección del haz

de luz, se mide A o T). Se suele utilizar para soluciones concentradas (para que haya una buena disminución de la luz transmitida) ej. determinación de proteínas totales en suero, LCR u orina (haciendo que las proteínas precipiten con TCA o ácido sulfosalicílico).

**La nefelometría:** mide la luz dispersada en dirección distinta a la luz emitida (generalmente con ángulos que oscilan entre 15 y 90°). Utiliza como instrumento el nefelómetro (en el que el detector se ubica con un ángulo que oscila entre 15 y 90° ej. a 90°). Se suele utilizar para concentraciones más diluidas.

**INMUNODIFUSIÓN** La inmunodifusión se basa en la formación de bandas de precipitación Ag-Ac en medios semisólidos (generalmente de agarosa). La formación de inmunocomplejos se ve afectada por variables como: pH, temperatura, fuerza iónica del medio, características propias del Ac como afinidad y avidéz y, la más importante, la concentración relativa de Ag y Ac. La zona óptima de concentración para la formación del precipitado Ag-Ac se llama zona de equivalencia. La inmunodifusión puede ser simple (sólo se mueve el Ag o el Ac) o doble (se mueven Ag y Ac). Para visualizar el resultado de la inmunodifusión, una vez terminada la difusión se lava el gel y se tiñe con colorantes para proteínas (ej. negro amido o azul brillante de Coomassie). La inmunodifusión se puede clasificar atendiendo a distintos criterios. Entre otras modalidades podemos hablar de: a) Inmunodifusión radial: en este caso se añade un antisuero específico a la agarosa que, a su vez, se vierte sobre placas. Se forman pozos en el gel y se colocan en ellos estándares de proteínas y problemas (antígenos). El antígeno difunde en el gel durante varias horas y va reaccionando con el Ac. En la zona de equivalencia se produce un anillo de precipitación

Inmunodifusión doble o técnica de Ouchterlony: se forman pozos en el gel de agarosa, generalmente en patrón de roseta. Se depositan antisueros específicos en los pozos centrales y los estándares de proteínas y los problemas en los pozos circundantes. Al difundir las muestras en el gel, donde el anticuerpo y el antígeno alcanzan la equivalencia, se forman bandas de precipitados insolubles. La posición y forma de la banda se determinan según la concentración del antígeno y del anticuerpo, y sus tamaños. La distancia de las bandas con respecto al anticuerpo es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente.

**ELECTROFORESIS** Una de las técnicas más sencillas para la separación (y posterior cuantificación) de proteínas es la electroforesis (técnica en la cual una partícula cargada se hace desplazar a través de un medio aplicando un campo eléctrico). Cuando se aplica un campo eléctrico a un medio que contiene partículas cargadas, las partículas cargadas negativamente migran hacia el ánodo o polo positivo mientras que, las cargadas positivamente migran hacia el electrodo negativo (cátodo). Este principio se puede aplicar para separar las fracciones de proteínas puesto que los aminoácidos (aa) constituyentes de la proteínas, y por tanto las proteínas, son compuestos anfóteros que se comportan como ácidos

**INMUNOELECTROFORESIS** La inmunolectroforesis es una inmunodifusión en la que se aplica una corriente eléctrica para separar las proteínas de la muestra. Esta técnica se realiza en dos fases: · Electroforesis para separar las proteínas de la muestra en función de su carga. · Aplicación de un antisuero, mono o poliespecífico, en un surco paralelo a la dirección del campo eléctrico. El o los anticuerpos

**INMUNOELECTROFORESIS EN COHETE** La inmunolectroforesis en cohete es una técnica cuantitativa equivalente a la inmunodifusión radial pero, a en la que la placa se expone a un campo eléctrico. Al igual que en la inmunodifusión radial, el antisuero (Ac) se incorpora al gel de manera que el Ac no pueda migrar. En el gel se realizan unos pocillos (generalmente en el cátodo) que se rellenarán con la muestra o con diluciones patrón. Una vez depositadas éstas se activa el campo eléctrico. El Ag se desplaza en la agarosa y precipita al encontrarse con el Ac. La precipitación va produciéndose a medida que el Ag avanza hacia el ánodo de manera que al ir disminuyendo la concentración de Ag los bordes laterales se van acercando hasta unirse. Así, se produce una precipitación triangular (en estela de cohete).

**INMUNOFIJACIÓN** La inmunofijación consiste en la separación electroforética de las proteínas de una muestra seguida del contacto del gel con una tira de acetato de celulosa impregnada con antisuero. La unión Ag-Ac da lugar a la formación de bandas de precipitación visulalizadas tras lavar y teñir. Es una técnica muy rápida que se utiliza especialmente en le detección de bandas oligoclonales en líquido cefalorraquídeo.

## CONCLUSION

Como hemos visto las distintas técnicas que nos permiten analizar desde un punto de vista cuali y cuantitativo, el contenido proteico de las muestras biológicas haciendo especial hincapié en el estudio de las proteínas plasmáticas, Las proteínas plasma-específicas (albúmina + globulinas) se sintetizan fundamentalmente en el hígado, pero también en: células plasmáticas, ganglios linfáticos, bazo y médula ósea. En caso de enfermedad, tanto la concentración total como la de las distintas fracciones pueden verse alteradas. Así, la determinación de las proteínas totales sirve para el diagnóstico de: · Afecciones hepáticas · Afecciones de la médula ósea · Otras afecciones del metabolismo o nutricionales y eso los sirve como médicos.

## Bibliografía

HARPER. (2013). *HARPER. BIOQUÍMICA ILUSTRADA*. Prolongación Paseo de la Reforma 1015, Torre A, Piso 17 C.P. 01376, México, D.F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.